

<p>84-046092/08      804 D16      SEKI 06.07.82 SEKISUI CHEMI IND KK      *J5 9006-897-A 06.07.82-JP-118089 (13.01.84) C12m-01/34 C12q-01 G01n-33/52 Analysis of specific component in sample of living body fluids - by heating sample to inactivate any enzymes present then passing through column contg. fixed enzyme and determining coenzyme obtd.</p>	<p>B(4-B2C1, 4-B2C3, 4-B2D, 4-B4D, 11-C7B, 12-K4) D(5-A1) 13!</p>
<p>C84-019401      Analysis of a component (I) in a living body, comprises (1) heating a sample contg. (I) so that enzymes which disturb the prescribed enzymic reaction are inactivated; (2) introducing the sample into a column packed with a fixed enzyme, which reacts with (I); and (3) analysing the prod. of the enzymic reaction, a reduced-type coenzyme. <u>USE/ADVANTAGE</u> The present method is applied, e.g. to the analysis of bile acid in serum. In order to analyse the content of bile acid in serum, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) is preliminarily added to the serum, and the mixt. is allowed to pass through a column packed with a fixed 3<math>\alpha</math>-hydroxy steroid-dehydrogenase, so as to promote the reaction between the bile acid and NAD. The fluorescent prod. is then colori-</p>	<p>metrically analysed. However, several enzymes in the serum disturb the reaction, resulting in analytical error. The present method prevents the disturbance of the contaminating enzymes. <u>DETAILS</u> The sample is usually heated at about 70°C. The whole analytical process is performed continuously. (3ppW42HDDwgNo0/1).</p>

J59006897-A

(435/288.6)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—6897

51 Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和59年(1984)1月13日

C 12 Q 1/00

8213—4B

G 01 N 33/52

8305—2G

C 12 M 1/34

6971—4B

発明の数 1

1/40

6971—4B

審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑭ 固定化酵素を用いた生体成分の定量法

大阪府三島郡島本町百山2番2号

⑮ 特 願 昭57—118089

⑯ 出 願 人 積水化学工業株式会社

⑰ 出 願 昭57(1982)7月6日

大阪市北区西天満2丁目4番4号

⑱ 発 明 者 伏見勝夫

## 明 細 書

## 発明の名称

固定化酵素を用いた生体成分の定量法

## 特許請求の範囲

1. 被測定成分を含む生体試料液を固定化酵素を入れたカラムに導入し、カラム内で固定化酵素と生体試料液を接触させて被測定成分の反応を生じさせ、反応生成物である還元型補酵素を検出器で測定することにより被測定成分量を定量する方法において、前記カラムに生体試料液を導入する前に生体試料液を加熱槽に導き被測定成分に対する妨害酵素を熱処理により予じめ不活性化しておくことを特徴とする、固定化酵素を用いた生体成分の定量法

## 発明の詳細な説明

本発明は固定化酵素を用いた生体成分の定量法に関する。

従来、生体成分、例えば血清中に微量に存在する胆汁酸等を定量する際に、胆汁酸等の被測定成分を例えば蛍光光度計等の検出器によつて直

接検出することが困難な場合には、酵素の触媒作用を利用して、被測定成分と酵素の存在下に反応する反応物を予め加えておいた試料液を固定化酵素が充填されたカラムに導き、そこで被測定成分と反応物を反応させ還元型補酵素を生成させ、これを蛍光検出器により検出し、試料液中に含まれる被測定成分の量を算出することが行われている。

例えば胆汁酸の定量においては、予めニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド（以下NAD<sup>+</sup>と略す）を加えた試料液を、酵素3-β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（以下3-β-HSDと略す）が固定化された担体が充填された固定化酵素カラムに通してそこで胆汁酸とNAD<sup>+</sup>とを反応させ、その結果、胆汁酸と等モル量の蛍光物質NADHを生成させて該NADHを蛍光光度計で検出するか、又は、上記で発生させたNADHをレサズリンの共存下で酵素リアクターゼの作用によつてNADに酸化させると同時にレサズリンを還元させて蛍光物質であ

特開昭59-6897(2)

らレゾルフィンを生産させ、該レゾルフィンの波長を測定することが行われている。

しかしながら生体試料中には種々の酵素、例えば胆汁酸分析の場合には乳酸脱水素酵素が含まれており、かかる酵素がカラム内で還元型補酵素を生成し、本来検出器で検出されるべきでないにも拘らず検出されて被測定成分の測定値に対して正の誤差を与える原因となる。したがって乳酸脱水素酵素のような、生体試料中の、被測定成分に対する妨害酵素を予じめ不活性化しておくことが要求されてきた。

このため従来から妨害酵素の不活性化のために、生体試料系外において一々希釈し次々を加熱したり、妨害酵素を不活性化するための薬剤を生体試料に混合することが行なわれてきた。しかし実験室的な規模で行なう場合はとも角、大規模の検体を処理するような場合には人手、手間が掛りすぎる欠点があつた。

本発明の要旨は、被測定成分を含む生体試料液を固定化酵素を入れたカラムに導入し、カラム

内で固定化酵素と生体試料液を接触させて被測定成分の反応を生じさせ、反応生成物である還元型補酵素を検出器で測定することにより被測定成分量を定量する方法において、前記カラムに生体試料液を導入する前に生体試料液を加熱槽に導き被測定成分に対する妨害酵素を熱処理により予じめ不活性化しておくことを特徴とする、固定化酵素を用いた生体成分の定量法に存する。

次に本発明の固定化酵素を用いた生体成分の定量法について図面を参照しながら更に詳細に説明する。

1は緩衝液槽であり、槽内の緩衝液には酵素の作用により被測定成分と反応しうる成分、例えば胆汁酸分析の場合は $\text{NAD}^+$ 等が加えられている。2は低圧定流量ポンプであり、緩衝液を定流量で送液するために設けられる。

3は被測定成分を含む生体試料の注入器であり、注入器3内で生体試料と緩衝液とが混合する。生体試料と緩衝液はコイル状の流通管路4を流

通する間に両者が均一に混合された生体試料液となる。5は加熱槽であり、流通管路4はこの加熱槽5に導かれて生体試料液が熱処理される。熱処理は生体試料中に含有される検出目的外の還元型補酵素を生成するような妨害酵素、例えば胆汁酸分析の場合には乳酸脱水素酵素等を不活性化するために施されるものであり、約70℃付近の温度に加熱されるのが好ましい。又、熱処理効果を向上させるために加熱槽5内に流通管路6もコイル状になされている。加熱槽5により熱処理が施された生体試料液は次いで流通管路7を通過される。この流通管路7は管の内径が細くなつており、加熱槽5での加熱により流通する生体試料液中に気泡が生じないように背圧をかけ、又加熱槽5を通過することにより加熱された生体試料液を放冷するために設けられている。

次いで生体試料液は固定化酵素を入れたカラム8に導入され、カラム8内で固定化酵素と生体試料液を接触させる。生体試料液はカラム8内

で酵素と反応することによりその触媒作用を受け、被測定成分が液中の反応成分と反応して反応生成物である還元型補酵素を生成する。還元型補酵素を生成した生体試料液は、カラム8を出た後検出器9に通し、還元型補酵素の定量が行なわれる。そして還元型補酵素の量から生体試料中の被測定成分の量を求めることができる。検出器9により還元型補酵素の定量が行なわれた生体試料液は系外に排出される。

本発明の方法によれば、カラムに生体試料液を導入する前に生体試料液を加熱槽に導き被測定成分に対する妨害酵素を熱処理により予じめ不活性化しておくことにより、生体試料中に含有される妨害酵素により被測定成分が検出目的外の還元型補酵素を生成することがないものとなり、精度よく被測定成分の定量が出来るものとなる。

#### 実施例

粒径約80ミクロンのセルロース微粒子を担体として用い、該微粒子5mlにイオン交換水5ml、2M炭酸ナトリウム水溶液10mlを加えて攪拌

特開昭59-6897(3)

したのち、これに予めシアニ化プロマイド 8 g を溶解したアセトニトリル 1 ml を加え、激しく攪拌しつつ 90 秒間反応させた。こうして活性化させたセルロース微粒子をすばやく 0.1 M 炭酸緩衝液 (PH 9.5)、イオン交換水及び 0.5 M の塩化ナトリウムを含む 0.1 M 炭酸緩衝液 (PH 9.5) で洗浄したのち、3 $\alpha$ -HSD 4.4 mg を溶解させた 0.5 M の塩化ナトリウムを含む 0.1 M 炭酸緩衝液 (PH 9.5) 5 ml を加え、室温で 2 時間攪拌して反応させた。

次に上記の処理により 3 $\alpha$ -HSD を固定化した微粒子表面に存在する活性点をブロックするため、0.05% の 2-メルカプトエタノールを含む 0.1 M トリス-炭酸緩衝液 (PH 8.0) 中で 4℃ で 2 時間反応させた。

かくして得られた酵素固定化微粒子を 0.5 M の塩化ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (PH 5.0)、イオン交換水及び 0.5 M の塩化ナトリウムを含む 0.1 M 炭酸緩衝液 (PH 9.5) で繰り返し洗浄したのち、長さ 100 mm、内径 4 mm

のカラムに充填し、固定化酵素充填カラムを用意した。

上記のようにして得たカラムを第 1 図のカラム 8 として用い、1 l 中に NAD<sup>+</sup> 19.9 mg を含む 0.1 M ピロリン酸緩衝液 (PH 9.5) を緩衝液槽 1 に入れ、次いで低圧定流量ポンプ 2 で 0.5 ml/分の流量で送液し、送液が安定した時点で健康人の血清 0.01 ml を注入器 3 から注入した。血清と緩衝液は管径が 0.8 mm のコイル状の流通管路 4 を通過する間に混合され約 10 倍に希釈された。次いで加熱槽 5 に管径が 0.8 mm のコイル状の流通管路 6 を通過する間に、加熱槽 5 内の 70℃ の熱水により約 1 分間の熱処理が施され、血清中に存在する乳酸脱水素酵素等の検出目的外の還元型補酵素を生成する妨害酵素が不活性化された。

更に管径が 0.25 mm の流通管路 7 を通過し、放冷された後、蛍光検出器により励起波長 360 nm、蛍光波長 460 nm で検出対象となる還元型補酵素が測定された。

-7-

-8-

クノデオキシコール酸を標準試料として検量線を作製し、試料血清の血中総胆汁酸量を求めると 5  $\mu$ mol/l であった。又比較のために加熱槽 5 を使用しない状態で測定した血中総胆汁酸量は 7  $\mu$ mol/l であった。

この結果は熱処理がされない場合は試料血清中に還元型補酵素を生成するような妨害酵素により 2  $\mu$ mol/l の正の誤差を生ずることを示している。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は本発明方法における生体成分の定量装置の概略図である。

#### 符号の説明

1 緩衝液槽、2 定流量ポンプ、3 注入器、4, 6, 7 流通管路、5 加熱槽、8 カラム、9 検出器

特許出願人

横水化学工業株式会社

代表者 藤 沼 基 利

-9-

図一

